



Docket No. 21295/47

GP/2872
11/14/02
RECEIVED
NOV -7 2002
TC 2800 MAIL ROOM

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Dr. Werner Knebel
Application No: 10/064,653 Group: 2872
Filed: August 2, 2002 Examiner: Unknown
Confirmation No: 3719

For: *Illumination Device and Illumination Method for a Scanning Microscope*

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this paper (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the: Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on:

By:

Deborah Celeste

Date

October 31, 2002

TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The above-referenced patent application claims priority, pursuant to 35 U.S.C. §119, from German Patent Application No. DE 101 39 754.2, filed on 13 August 2001. To perfect this claim of priority, Applicant hereby submits a certified copy of the priority application of German Patent Application No. DE 101 39 754.2.

Respectfully submitted,

Dated: *October 31, 2002*

By:

Maria M. Eliseeva

Maria M. Eliseeva
Reg. No. 43,328
Attorney for Applicants
Customer Number: 21710
Brown Rudnick Berlack Israels, LLP
Box IP
One Financial Center
Boston, MA 02111
Tel: 617-856-8340
Fax: 617-856-8201

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



RECEIVED
NOV - 7 2002
TC 2800 MAIL ROOM

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 39 754.2

Anmeldetag: 13. August 2001

Anmelder/Inhaber: LEICA Microsystems Heidelberg
GmbH, Mannheim/DE

Bezeichnung: Beleuchtungsverfahren für ein Scan-
mikroskop und Scanmikroskop

IPC: G 02 B 21/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. Juli 2002
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

Agurks

Beleuchtungsverfahren für ein Scanmikroskop und Scanmikroskop

Die Erfindung betrifft eine Einrichtung zum Beleuchten von Objekten in einem Scanmikroskop mit einem Laser zur Erzeugung eines Laserstrahls. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Beleuchtung von Objekten mit einer
5 derartigen Einrichtung, sowie ein Scanmikroskop.

In der Scanmikroskopie wird ein Objekt mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von dem Objekt daraufhin emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten, wobei zur Beleuchtung üblicherweise Laserstrahlen eingesetzt
10 werden. Dabei wird das Objekt mittels eines fein fokussierten Lichtstrahls abgetastet. Speziell in der konfokalen Scanmikroskopie wird das Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet. Ein konfokales Scanmikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sogenannte
15 Anregungsblende - fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das von dem Objekt kommende Fluoreszenz- oder
20 Reflexionslicht gelangt über die Strahlablenkeinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren, meist Photomultiplier, befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man
25 eine Punktinformation erhält, die durch sequentielles Abtasten des Objekts zu einem dreidimensionalen Bild führt.

- In vielen dieser Anwendungen ist die Wellenlänge des verwendeten Beleuchtungslichtes, also insbesondere die Verwendung des eingesetzten Laserlichtes von entscheidender Bedeutung. Bei der Untersuchung
- 5 zellbiologischer Objekte können diese beispielsweise mit unterschiedlichen Farbstoffen in verschiedenen Bereichen gekennzeichnet werden. Die so gekennzeichneten Objekte können dann mit Hilfe der konfokalen Scanmikroskopie, untersucht werden, wobei die verschiedenen Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt werden. Hierzu ist es allerdings erforderlich, dass eine
- 10 Wellenlänge eingestrahlt wird, mit deren Hilfe der jeweilige Farbstoff angeregt werden kann. Da diese Wellenlängen je nach Farbstoff unterschiedlich sind, ist es nötig, im sogenannten Ein-Photonen-Verfahren, die Untersuchung mit den jeweils passenden Wellenlängen durchzuführen.
- 15 Um die Proben bei der Untersuchung so weit wie möglich zu schonen, wird bereits das sogenannte Zwei-Photonen-Verfahren eingesetzt. Dabei wird ein mit Farbstoffen markiertes Objekt mit Hilfe von Lasern, die ultrakurze Laserimpulse mit gleichzeitiger hoher Pulsspitzenleistung emittieren, bestrahlt. Im Fokus dieser Laserstrahlung ist eine genügend hohe Photonendichte
- 20 verfügbar, um nicht-lineare optische Effekte, wie z.B. eine Zwei-Photonen-Absorption, zu erzeugen. Mit Hilfe dieses Effektes ist es möglich, Farbstoffe mit Photonen anzuregen, deren Energie lediglich der Hälfte der an sich benötigten Anregungsenergie entspricht, wobei jedoch zwei dieser Photonen an der Erzeugung dieses Anregungszustandes beteiligt und hierzu auch nötig
- 25 sind. Jedoch ist die Anzahl der geeigneten Laser bei den entsprechenden Wellenlängen beschränkt, so dass damit die Untersuchungsmöglichkeiten der Probe auf die Verwendung weniger, zu diesen Wellenlängen passender Farbstoffe beschränkt ist.
- 30 In der US 6,154,310 wurde schon vorgeschlagen, einen nichtlinearen optischen Effekt in Wellenleitern zu nutzen, der es ermöglicht, die Wellenlänge

eines Lasers, der ultrakurze Pulse erzeugt, zu verändern. Hierzu wird der Laserpuls einer Mehrzahl von Wellenleiterelementen zugeführt. In diesen Wellenleiterelementen wird die Wellenlänge des Laserlichts jeweils individuell verändert. Anschließend werden die aufgeteilten Lichtbündel aus der

5 Mehrzahl von Wellenleitern wieder zu einem einzigen Strahl vereinigt. Dadurch wird eine neue Ausgangswellenlänge erzeugt, die zum Mikroskopieren verwendet werden kann. Damit kann zwar der Wellenlängenbereich über den üblichen Wirkungsbereich eines Titan:Saphir-Lasers (TiSa-Laser) hinaus erweitert werden, jedoch bleibt die Anzahl der

10 erzielbaren Wellenlängen beschränkt.

Da es in der Scanmikroskopie u. a. wünschenswert ist, die Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Anregung an einem zu untersuchenden Objekt während eines Mikroskopiervorgangs einzusetzen, ist es dennoch erforderlich,

15 unterschiedliche Lichtquellen, insbesondere unterschiedliche Laserlichtquellen mit verschiedenen Wellenlängen einzusetzen und zwischen diesen umschalten zu können. Üblicherweise werden daher zur Beleuchtung des Objektes mehrere Strahlungsquellen verwendet, die über sogenannte Ports, zwischen denen umgeschaltet werden kann, in ein Mikroskop eingekoppelt

20 werden. In den sogenannten Zwei-Photonen-Port kann insbesondere ein modengekoppelter TiSa-Laser und in den Ein-Photonen-Port können konventionelle Gaslaser für UV- und/oder visuelle Anregung eingekoppelt werden. Eine Umschaltung zwischen beiden Ports ist zwar möglich, aber sehr kompliziert; denn dabei werden wenigstens zwei akustooptische einstellbare

25 Filter (AOTFs), akustooptische Modulatoren (AOMs) und/oder elektrooptische Modulatoren (EOMs) sowie ein spezielles Steuerbord benötigt, mit dem die Schaltung angesteuert und synchronisiert werden kann. Auch die oben beschriebene Erweiterung des Wellenlängenbereiches eines TiSa-Lasers kann dieses Problem nicht befriedigend lösen, da hierbei der Strahl des

30 Lasers mit Hilfe eines Strahlteilers geteilt und der erste Teil zur Frequenzkonversion und der andere Teil direkt zur Beleuchtung der Probe genutzt wird. Somit steht für beide Teile des Strahls lediglich ein Teil der

- Energie zur Verfügung, so dass einerseits die Beleuchtungsintensität auf der Probe geringer als erwünscht ist und andererseits nicht die volle Laserenergie zur Frequenzkonversion zur Verfügung steht. Die Benutzung eines Strahlteiles legt zudem ein festes Teilverhältnis der beiden Teilstrahlen fest. Erst ein
- 5 Tauschen des Strahlteilers ermöglicht ein anderes festes Teilverhältnis. Diese Umstellung erfordert Zeit- und eventuell Justieraufwand. Eine kontinuierliche oder schnelle Variation zwischen verschiedenen Teilverhältnissen ist nicht möglich.
- 10 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht entsprechend darin, eine Einrichtung zum Beleuchten eines Objektes in einem Mikroskop sowie ein Verfahren zum Beleuchten des Objektes in dem Mikroskop vorzuschlagen, bei dem mehrere Beleuchtungsmöglichkeiten verwirklicht sind, zwischen denen schnell umgeschaltet werden kann.
- 15 Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch eine Einrichtung zum Beleuchten von Objekten in einem Scanmikroskop mit den Merkmalen gemäß Anspruch 1 gelöst. Die verfahrenstechnische Lösung besteht in einem Verfahren zum Beleuchten eines Objektes in einem Scanmikroskop mit den Merkmalen
- 20 gemäß Anspruch 10.
- 25 Erfindungsgemäß ist in einem Scanmikroskop eine Einrichtung zur Beleuchtung der zu untersuchenden Objekte vorgesehen, wobei zunächst mit einem Laser eine Laserstrahlung erzeugt wird. Diese Laserstrahlung wird über eine Optik auf das zu untersuchende Objekt geführt. Dabei ist im Strahlengang der Beleuchtungseinrichtung eine schaltbare Umlenkeinrichtung vorgesehen, mit deren Hilfe es möglich ist, den einfallenden Laserstrahl entweder entlang eines ersten Weges oder entlang eines alternativen Weges dem Mikroskop und damit dem Objekt zuzuführen. Die schaltbare
- 30 Strahlumlenkeinrichtung ist dabei bevorzugt so ausgeführt, dass sie die einfallende Laserstrahlung im Wesentlichen vollständig entlang des ersten

oder im Wesentlichen vollständig entlang des alternativen Weges lenkt. Ganz besonders bevorzugt ist die Strahlumlenkeinrichtung so ausgeführt, dass das Teilverhältnis der einfallenden Laserstrahlung entlang des ersten und entlang des alternativen Weges kontinuierlich variierbar ist. Während die
5 Laserstrahlung entlang des ersten Weges zumindest im Hinblick auf ihre Frequenz im Wesentlichen unverändert bleibt, ist im Strahlengang des alternativen Weges ein Bauteil zur Frequenzkonversion des Laserstrahles vorgesehen. Damit ist es also möglich, den ersten Weg für eine erste Beleuchtungsart und den zweiten Weg für eine zweite Beleuchtungsart zu
10 nutzen. Somit kann mit einer einzigen Beleuchtungsquelle, etwa einem Kurzpulslaser, die Beleuchtung des Objektes unter verschiedenen Beleuchtungsbedingungen realisiert werden. Die schaltbare Strahlumlenkeinrichtung ist dabei bevorzugt so ausgeführt, dass ein schnelles Umschalten zwischen dem ersten und dem alternativen Weg möglich wird.
15 Wahlweise ist ein schnelles Umschalten zwischen verschiedenen Teilverhältnissen der Laserstrahlung entlang des ersten und entlang des alternativen Weges realisierbar. Üblicherweise erfolgt die Einkopplung der Laserstrahlung entlang des ersten Weges in den sog. Zwei-Photonen-Port und die Einkopplung der Laserstrahlung entlang des alternativen Weges in
20 den Ein-Photonen-Port, da sich auf diese Weise die Ein-Photonen-Anregung bzw. Zwei-Photonen-Anregung verwirklichen lassen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird als nutzbare Ausgangslichtquelle ein modengekoppelter TiSa-Kurzpulslaser verwendet. Als schnell schaltbare
25 Strahlumlenkeinrichtung kann dabei ein elektrooptischer Modulator (EOM) verwendet werden, der mit einer Spannungsquelle verbunden ist. Die Spannungsquelle wirkt dabei so auf den EOM ein, dass die Polarisationsrichtung des einfallenden Lichtes gedreht werden kann. Wird dann im Strahlengang ein Polarisationsstrahlteiler vorgesehen, so kann damit
30 die volle Laserleistung entweder entlang des ersten Weges über den Zwei-Photonen-Port zur Beleuchtung des Objektes genutzt werden oder entlang des alternativen Weges, in voller Leistung der Frequenzkonversion zur

Verfügung gestellt werden. Die Kombination aus EOM, insbesondere verbunden damit die Einstellmöglichkeit einer beliebigen Polarisationsrichtung der Laserstrahlung, und Polarisationsstrahlteiler ermöglicht darüber hinaus eine beliebige Variation der Laserleistung entlang des ersten und entlang des alternativen Weges.

Als Mittel zur Frequenzkonversion kommen an sich alle Bauteile in Betracht, mit deren Hilfe es möglich ist, die Frequenz einer einfallenden Beleuchtungsstrahlung zu verändern. Insbesondere kann die Frequenz bei der Frequenzkonversion auch verbreitert werden, so dass am Ausgang der Frequenzkonversion polychromatisches Licht vorliegt, aus dem mit Hilfe eines geeigneten Filters das gewünschte Frequenzband ausgesondert werden kann. Mit der erfindungsgemäßen Einrichtung ist es also möglich, insbesondere bei biologischen oder chemischen Prozessen, die mit Hilfe eines Scanmikroskopes beobachtet werden sollen, zwei unterschiedliche Anregungsformen zu verwenden und zwischen beiden schnell umzuschalten. Bei einem zeilenweisen Abtasten des Objektes kann beispielsweise auch zeilenweise zwischen dem Ein- und dem Zwei-Photonen-Port umgeschaltet werden. Damit lässt sich eine hohe Zeitauflösung erzielen, die besonders für biologische und chemische Prozesse von großer Wichtigkeit ist.

Selbstverständlich kann das Umschalten auch im Rahmen einer sogenannten „Region-of-Interest“ (ROI)-Abtastung erfolgen. Dabei wird die Probe im Allgemeinen mit dem Laserlicht aus dem Ein-Photonen-Port beleuchtet und in besonders interessierenden Bereichen (ROIs) auf den Zwei-Photonen-Port umgeschaltet, so dass innerhalb der ROIs mit dem Zwei-Photonen-Port objektschonend gescannt wird.

Weitere Vorteile und vorteilhafte Ausführungsformen sind Gegenstand der nachfolgenden Figurenbeschreibung, bei deren Darstellung zugunsten der

Übersichtlichkeit auf eine maßstabsgetreue Wiedergabe verzichtet wurde. Es zeigen im Einzelnen:

- Fig. 1 : eine Lichtquelle gemäß dem Stand der Technik,
- 5 Fig. 2: eine schematische Darstellung eines Scanmikroskopsystems gemäß dem Stand der Technik,
- Fig. 3 : eine schematische Darstellung eines Scanmikroskopsystems gemäß der gegenwärtigen Erfindung,
- 10 Fig. 4a: ein erster Arbeitsmodus des Systems aus Fig. 3,
- Fig. 4b: ein zweiter Arbeitsmodus des Systems aus Fig. 3,
- Fig. 5: ein Beispiel der Beleuchtung eines mikroskopischen Präparats mit dem System aus Fig. 3.
- 15 Fig. 1 zeigt eine Beleuchtungseinrichtung 10 gemäß dem Stand der Technik. Als Beleuchtungsquelle 12 ist ein Puls laser vorgesehen, der als modengekoppelter Titan:Saphir-Laser (TiSa-Laser) ausgeführt ist. Das Licht 14 des Puls lasers wird mit dem Mittel zum räumlichen Aufteilen des Lichts, das als Strahlteiler 16 ausgeführt ist, in einen ersten und zweiten Teillichtstrahl
- 20 17 und 18 aufgespalten. Der Teillichtstrahl 18 gelangt über den Spiegel 20 zum Zwischenelement 21, das als optisch parametrischer Oszillator ausgeführt ist. Der vom optisch parametrischen Oszillator 21 ausgehende Teillichtstrahl 22 kann direkt in einen Ein-Photonen-Port eines Mikroskops eingekoppelt werden, während der Teilstrahl 17 über einen Zwei-Photonen-
- 25 Port einem Mikroskop zugeführt werden kann.

Wie aus Figur 1 klar ersichtlich, wird bei dieser Methode gemäß dem Stand der Technik das von der Beleuchtungsquelle 12 ausgehende Licht 14 aufgeteilt, so dass die volle Leistung der Beleuchtungsquelle weder für die

Frequenzkonversion noch für die Beleuchtung des Objektes zur Verfügung steht.

Figur 2 zeigt schematisch eine weitere Beleuchtungseinrichtung 10 gemäß dem Stand der Technik. Ein Scanmikroskop 28 kann dabei wahlweise aus einem Ein-Photonen-Port 30 oder einem Zwei-Photonen-Port 32 beleuchtet werden. Zur Versorgung des Ein-Photonen-Ports ist dabei eine UV-Lichtquelle 34 und eine Lichtquelle für visuelles Licht 36 vorgesehen. Mit Hilfe eines UV-AOTFs (acousto optical tunable filter) 38 ist die Leistung und die Wellenlänge des UV-Lichts 35 einstellbar. Die Wellenlänge und die Leistung des visuellen Lichts 37 wird mit einem AOTF 39, der für das sichtbare Spektrum geeignet ist, selektiert. Die Lichtquelle für den Zwei-Photonen-Port 32 besteht aus einem Infrarot-Kurzpulslaser 31, dessen Leistung mit Hilfe eines EOM oder akusto-optischen Modulators (AOM) 40 variierbar ist. Die Umschaltung zwischen dem Ein- und Zwei-Photonen-Port erfolgt nun durch ein spezielles Steuerbord 44, das über die Steuerleitungen 41 und 42 mit den AOTFs 38 und 39 verbunden sind. Über die Steuerleitung 43 ist das Steuerbord 44 mit dem EOM oder AOM 40 verbunden. Das Steuerbord 44 ist dabei so ausgelegt, dass zum Mikroskopieren entweder der Ein-Photonen-Port oder der Zwei-Photonen-Port aktiv ist, d.h. das zwischen beiden Ports über das Steuerbord 44 umgeschaltet werden kann. Wie aus Figur 2 ersichtlich, sind bei dieser Einrichtung zur Beleuchtung gemäß dem Stand der Technik mehrere Lichtquellen 31, 3, 36 erforderlich. Darüber hinaus ist eine sehr komplexe Steuereinrichtung 44, 38, 39, 40 erforderlich, um zwischen den beiden Ports umschalten zu können.

Figur 3 zeigt in einer Prinzipdarstellung eine Einrichtung 10 zur Beleuchtung von Objekten 11 gemäß der vorliegenden Erfindung. Dabei ist es wiederum möglich, ein Scanmikroskop 28 über einen Zwei-Photonen-Port 32 oder einen Ein-Photonen-Port 30 zu beleuchten. In der Beleuchtungseinrichtung 10 ist hierzu ein IR-Kurzpulslaser 46 vorgesehen, der einen Laserstrahl 48 erzeugt.

Dieser Laserstrahl wird einer schaltbaren Strahlumlenkeinrichtung 50 zugeführt. Die schaltbare Strahlumlenkeinrichtung 50 weist bevorzugt einen EOM 51 auf, der mit einer Hochspannungsquelle 53 verbunden ist. In der schaltbaren Strahlumlenkeinrichtung 50 ist weiterhin bevorzugt ein

5 Polarisationsstrahlteiler 55 vorgesehen. Dabei sind die in der schaltbaren Strahlumlenkeinrichtung 50 vorgesehenen Elemente 51, 53, 55, so ausgeführt, dass sie, je nach Ansteuerung, den einfallenden Laserstrahl mit im Wesentlichen unveränderter Intensität entlang des ersten Weges 52 oder mit im Wesentlichen unveränderter Intensität entlang des alternativen Weges 54

10 leiten können. Entlang des alternativen Weges 54 ist weiterhin ein Bauteil zur Frequenzkonversion 56 vorgesehen. Das Bauteil zur Frequenzkonversion 56 ist dabei so ausgeführt, dass der einfallende Laserstrahl 48 in seiner Frequenz so konvertiert werden kann, dass an dem Ein-Photonen-Port 30 eine Strahlung zur Verfügung gestellt wird, mit deren Hilfe es möglich ist, das

15 Scanmikroskop 28 so zu betreiben, dass eine Ein-Photonen-Anregung des beleuchteten Objektes durchgeführt werden kann. Dabei kann es weiterhin erforderlich sein, ein Bauteil zur Wellenlängenselektion 58 und/oder ein Bauteil zur Intensitätsvariation 59 vorzusehen, mit deren Hilfe sich die Lichtstrahlparameter am Ein-Photonen-Port 30 steuern lassen.

20

In Figur 4a ist die Wirkungsweise der schaltbaren Strahlumlenkeinrichtung 50 anhand der Umschaltung in den alternativen Weg 54 dargestellt. Der aus dem IR-Kurzpulslaser 46 kommende Laserstrahl 48 gelangt durch den EOM 51. Der EOM 51 steht mit der Hochspannungsquelle 53 in Verbindung. Sofern von

25 der Hochspannungsquelle 53 am EOM 51 keine Spannung erzeugt wird, passiert der Laserstrahl 48 den EOM 51 unverändert, d.h. die Polarisationsrichtung des Laserlichtes ist vor und nach Passieren des EOM 51 gleich. Der Polarisationsstrahlteiler 55 ist in diesem Falle so ausgelegt, dass das ankommende Licht mit p-Polarisation 60 nahezu vollständig

30 durchgelassen und dem Bauteil zur Frequenzkonversion 56 zugeführt wird. Die Frequenzkonversion kann dabei mit allen bekannten Mitteln erfolgen. Insbesondere kann hierzu ein Mittel zur Frequenzvervielfachung eingesetzt

- werden, ein OPO, oder eine Weißlichterzeugung in einem optischen mikrostrukturierten Material erfolgen. Besonders geeignet ist hierbei auch die in der US 6,097,870 bereits beschriebene Möglichkeit zur Generierung eines Breitbandspektrums im sichtbaren und infraroten Spektralbereich. Bei dieser
- 5 Methode wird die Frequenzkonversion dadurch erzeugt, dass die einfallende Lichtstrahlung in einen speziellen Wellenleiter eingeleitet wird, der einen speziellen Kern und eine Ummantelung aufweist. Bei diesem Wellenleiter sind zur Erzeugung des gewünschten Effektes die Eigenschaften des Kernes und der Brechungsunterschied zwischen dem Kern und dem Mantel aufeinander
- 10 abgestimmt. Die Frequenzkonversion kann aber auch mit dem in der US 6,154,310 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden, bei dem das einfallende Laserlicht in eine Mehrzahl optischer Fasern eingeleitet, in diesen Fasern frequenzkonvertiert und anschließend wieder zusammengeführt wird. Darüber hinaus sind auch bereits Verfahren bekannt, mit deren Hilfe die
- 15 Konvertierung ultrakurzer Impulse eines TiSa-Lasers in Weißlicht erfolgen kann, so dass nach der Frequenzkonversion ein polychromes Licht mit einem Spektrum von etwa 350 bis 1600nm erzeugt werden kann, das für viele verschiedene Prozesse nutzbar ist. Mit Hilfe dieses konvertierten Lichtes ist es beispielsweise möglich, Verfahren wie Cage-Compound-Release,
- 20 physiologische Marken wie etwa pH, Calcium-Membranpotential-Indikation oder Kernfärbung auszunutzen. Die hierzu üblicherweise erforderliche Selektion des gewünschten Frequenzbandes kann über einen nachgeschalteten Filter (nicht gezeigt) erfolgen.
- 25 In Figur 4b sind die Verhältnisse bei Umlenkung des Laserstrahles in den Zwei-Photonen-Port gezeigt. Das aus dem IR-Kurzpulslaser 46 ausgehende Laserlicht 48 weist beispielsweise eine p-Polarisation 60 auf. An der Hochspannungsquelle 53 liegt nun eine Spannung an, die geeignet ist, den EOM 51 so zu steuern, dass die einfallende p-polarisierte Strahlung in ihrer
- 30 Polarisationsrichtung 55 um 90° gedreht wird. Die nun in s-Polarisation 62 vorliegende Laserstrahlung wird dann am Polarisationsstrahlteiler im Wesentlichen vollständig in Richtung des ersten Weges 52, d.h. also in

Richtung des Zwei-Photonen-Ports 32 umgelenkt. Das Laserlicht gelangt somit nicht zur Frequenzkonversion und steht vollständig zur Untersuchung der Probe über den Zwei-Photonen-Port zur Verfügung.

- 5 Mit der vorliegenden Erfindung ist mit nur einem einzigen EOM in Kombination mit einem einzigen Polarisationsstrahlteiler eine Möglichkeit geschaffen, einem Mikroskop die erforderliche Strahlung für einen Ein- und Zwei-Photonen-Port zur Verfügung zu stellen. Sofern am EOM keine Spannung anliegt, passiert ein beispielsweise linear polarisierter Laserstrahl (etwa p-Polarisation) den EOM 51 mit derselben Polarisation und wird am
- 10 Polarisationsstrahlteiler nahezu vollständig transmittiert und der Frequenzkonversion zugeleitet. Liegt am EOM 51 eine sogenannte $\lambda/2$ -Spannung an, wird die Polarisationsrichtung des Lichtstrahls gerade um 90° gedreht. An dem Polarisationsstrahlteiler 55 kommt es zu nahezu
- 15 vollständiger Reflektion des einstrahlenden Lichtes, das damit anschließend am Zwei-Photonen-Port des Mikroskops zur Verfügung steht. Da die Umschaltung des EOM mit einer Frequenz von ca. 100kHz erfolgen kann, besteht hiermit eine außergewöhnlich schnelle Möglichkeit, zwischen unterschiedlichen Beleuchtungsarten in einem Mikroskop umzuschalten. Dies
- 20 kann beispielsweise dazu genutzt werden, dass beim Abtasten eines Objektes ein zeilenweises Umschalten zwischen dem Ein- und dem Zwei-Photonen-Port erfolgen kann.

Wie bereits beschrieben ist es auch denkbar, den EOM 51 mit beliebigen Spannungen zwischen 0V und der $\lambda/2$ -Spannung anzusteuern und zwischen

25 verschiedenen Spannungswerten schnell hin und her zu schalten. In dem Fall kann eine variable Weiche für simultane Aufteilung des Laserlichtes generiert werden.

Wie in Figur 5 gezeigt ist es aber auch möglich, mit diesem Mikroskop einen außergewöhnlich schnellen sogenannten ROI-Scan (Region of Interest)

30 durchzuführen. Bei dieser Untersuchungsart der Probe wird der Lichtstrahl aus dem Ein-Photonen-Port 68 kommend so lange über die Probe geführt, bis

eine besonders interessierende Stelle der Probe (ROI) erreicht wird. Sobald der Strahl den Umschaltort 64 erreicht, wird der Umschaltvorgang ausgelöst und auf den Zwei-Photonen-Port 32, wie oben beschrieben, umgeschaltet. Der Scan der ROI erfolgt dann mit dem Lichtstrahl aus dem Zwei-Photonen-Port 70 bis zum Umschaltort 66, wo wieder auf den Ein-Photonen-Port 30 umgeschaltet wird. Auf diese Weise ist es möglich, das Objekt 11 nicht nur durch zeilenweise Umschaltung zwischen dem Ein- und dem Zwei-Photonen-Port zu beleuchten, sondern auch gezielt Änderungen in der Beleuchtungsart dann durchzuführen, wenn besonders interessierende Bereiche abgetastet werden. Da die Umschaltung zwischen den Beleuchtungsarten besonders schnell erfolgen kann, ist dies auch für sehr kleine ROIs möglich.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

	10	Einrichtung	11	Objekt
	12	Beleuchtungsquelle		
5	14	Licht		
	16	Strahlteiler		
	17	erster Teilstrahl		
	18	zweiter Teilstrahl		
	20	Spiegel		
10	21	Zwischenelement (parametrischen Oszillator)		
	22	Teillichtstrahl		
	26	Beleuchtungslicht		
	28	Scanmikroskop		
	30	Ein-Photonen-Port		
15	31	Infrarot-Kurzpulslaser		
	32	Zwei-Photonen-Port		
	34	UV-Lichtquelle		
	35	UV-Licht		
	36	Lichtquelle für visuelles Licht		
20	37	visuelles Licht		
	38	AOTF		
	39	AOTF		
	40	EOM/AOM		
	41	Steuerleitung		
25	42	Steuerleitung		
	43	Steuerleitung		
	44	Steuerboard		
	46	IR-Kurzpulslaser		
	48	Laserstrahl		
30	50	schaltbare Strahlumlenkeinrichtung		
	51	EOM		
	52	erster Weg		
	53	Hochspannungsquelle		

	54	alternativer Weg
	55	Polarisationsstrahlteiler
	56	Bauteil zur Frequenzkonversion
	58	Bauteil zur Wellenlängenselektion
5	59	Bauteil zur Intensitätsvariation
	60	p-Polarisation
	62	s-Polarisation
	64	Umschaltort
	66	Umschaltort
10	68	Lichtstrahl aus dem Ein-Photonen-Port
	70	Lichtstrahl aus dem Zwei-Photonen-Port

- 5 5. Einrichtung nach Anspruch 4 dadurch gekennzeichnet, dass die
Einrichtung zur Frequenzkonversion (56) des Laserstrahls eine
Filtereinrichtung zur Aussonderung eines Wellenlängenbandes
aufweist.
- 10 6. Einrichtung nach Anspruch 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, dass die
Einrichtung zur Frequenzkonversion (56) des Laserstrahls einen
zweiten Laser, ein optisch mikrostrukturiertes Material, einen OPO
oder eine Einrichtung zur Frequenzvervielfachung aufweist.
- 15 7. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch
gekennzeichnet, dass mehrere schaltbare Strahlablenkeinrichtungen
(50) und mehrere alternative Wege parallel zueinander vorgesehen
sind.
- 20 8. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 dadurch
gekennzeichnet, dass die schaltbare Strahlablenkeinrichtung (50)
geeignet ist, den Laserstrahl (48) im Wesentlichen vollständig
entweder entlang des ersten Weges (52) oder im Wesentlichen
vollständig entlang des alternativen Weges (54) zu lenken.
- 25 9. Scanmikroskop mit einer Einrichtung (10) zur Beleuchtung von
Objekten nach einem der Ansprüche 1 –8.
10. Verfahren zur Beleuchtung von Objekten (11) in einem
Scanmikroskop (28) wobei als Beleuchtungsquelle (12) ein Laser
verwendet und das von dem Laser ausgehende Licht (14, 48) einem
Objekt (11) zugeführt wird dadurch gekennzeichnet, dass

5

10

- der Laserstrahl auf eine schaltbare Strahlableitenrichtung (50) gerichtet wird,
- der Strahl von der schaltbaren Strahlableitenrichtung (50) im Wesentlichen ungeschwächt entlang eines ersten Weges (52) oder im Wesentlichen ungeschwächt entlang eines alternativen Weges (54) gerichtet wird,
- der Strahl entlang des alternativen Weges (54) in seiner Frequenz verändert wird,
- der Strahl nach dem Passieren des ersten Weges (52) oder alternativen Weges (54) auf das Objekt (11) gerichtet wird.

15

20

25

11. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass die schaltbare Strahlableitenrichtung (50) so angesteuert wird, dass bei einer zeilenweisen Beleuchtung des Objektes ein zeilenweises Umschalten zwischen dem ersten Weg (52) und dem alternativen Weg (54) erfolgt.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11 dadurch gekennzeichnet, dass zur Veränderung der Frequenz des Laserlichts auf dem alternativen Weg (54) eine optische Faser verwendet wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, dass das Laserlicht auf dem alternativen Weg (54) in eine Mehrzahl von optischen Fasern gerichtet wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-12 dadurch gekennzeichnet, dass die Frequenzänderung so erfolgt, dass Weißlicht entsteht.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-14 dadurch gekennzeichnet, dass Licht entlang des ersten Weges (52) dem Zwei-Photonen-Port (32) und Licht entlang des alternativen Weges dem Ein-Photonen-Port (30) eines Scanmikroskop (28) zugeführt wird.

5

16. Verfahren nach Anspruch 15 dadurch gekennzeichnet, dass das Objekt (11) besonders interessierende Bereiche (ROIs) aufweist und die Steuerung der schaltbaren Strahlumlenkeinrichtung (50) so erfolgt, dass die Beleuchtung innerhalb der ROIs mit dem Lichtstrahl aus dem Zwei-Photonen-Port (70) und außerhalb der ROIs mit dem Lichtstrahl aus dem Ein-Photonen-Port (68) erfolgt.

10

Zusammenfassung

Bei der Beleuchtung von Objekten in einem Scanmikroskop ist es zur Untersuchung der Probe oft erforderlich, Strahlungen unterschiedlicher Wellenlänge zu verwenden. Es wird eine Einrichtung sowie ein Verfahren zur Beleuchtung von Objekten in einem Scanmikroskop vorgeschlagen, wobei einen Laser zur Erzeugung eines Laserstrahls und einer Optik zur Abbildung des Laserstrahls auf das Objekt eingesetzt werden. Die Optik weist eine schaltbare Strahlumlenkeinrichtung auf, die den Laserstrahl entweder entlang eines ersten Weges oder entlang eines alternativen Weges auf das Objekt lenken kann. Weiterhin ist eine Einrichtung zur Frequenzkonversion im Strahlengang des alternativen Weges angeordnet.

Fig. 3

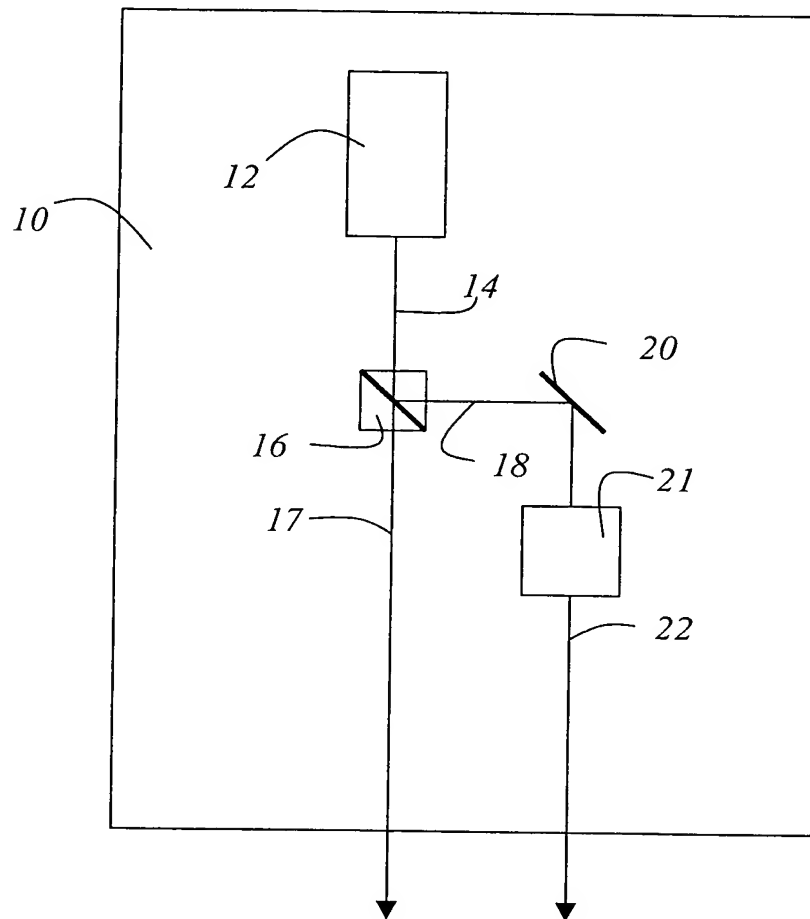
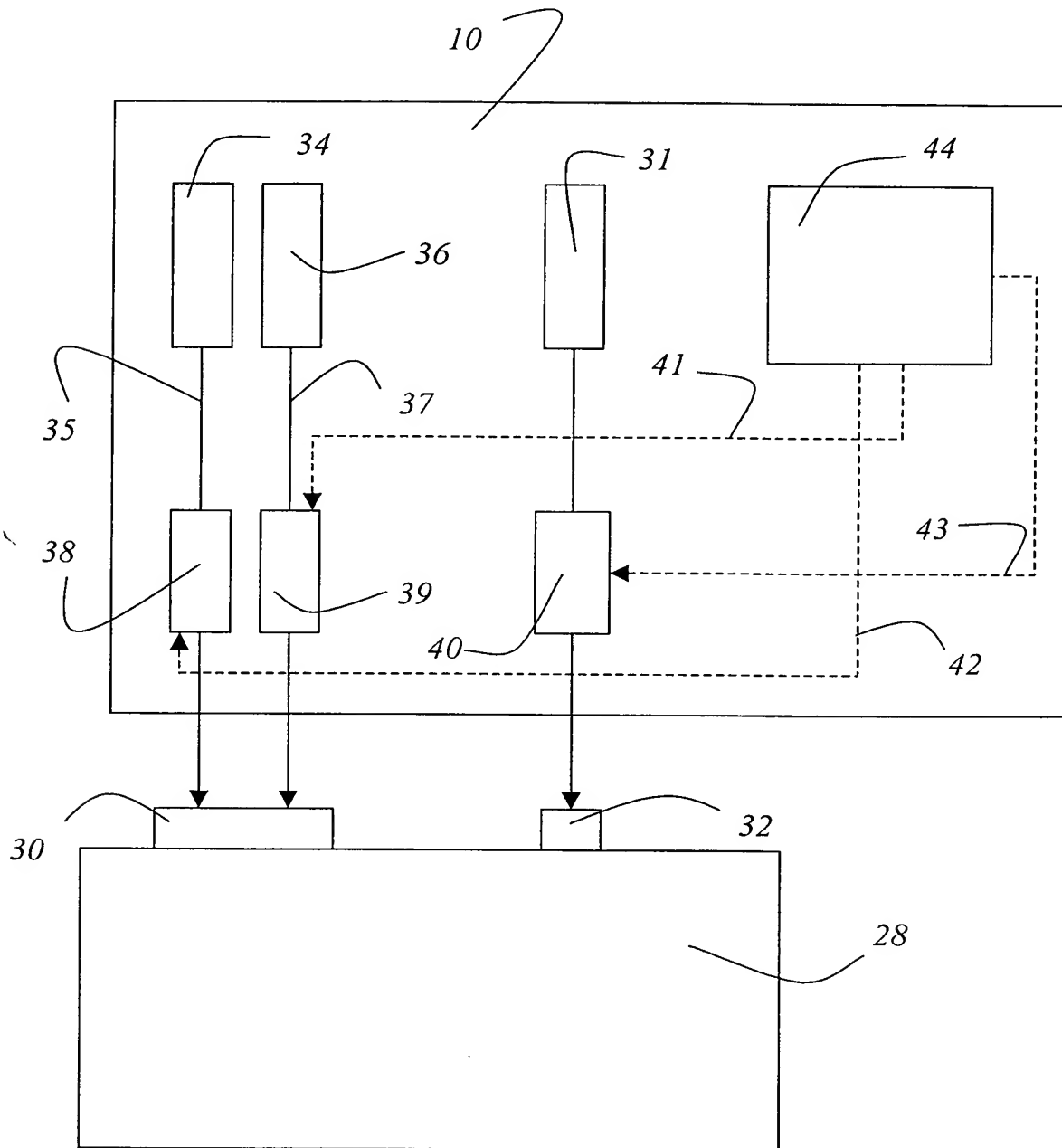
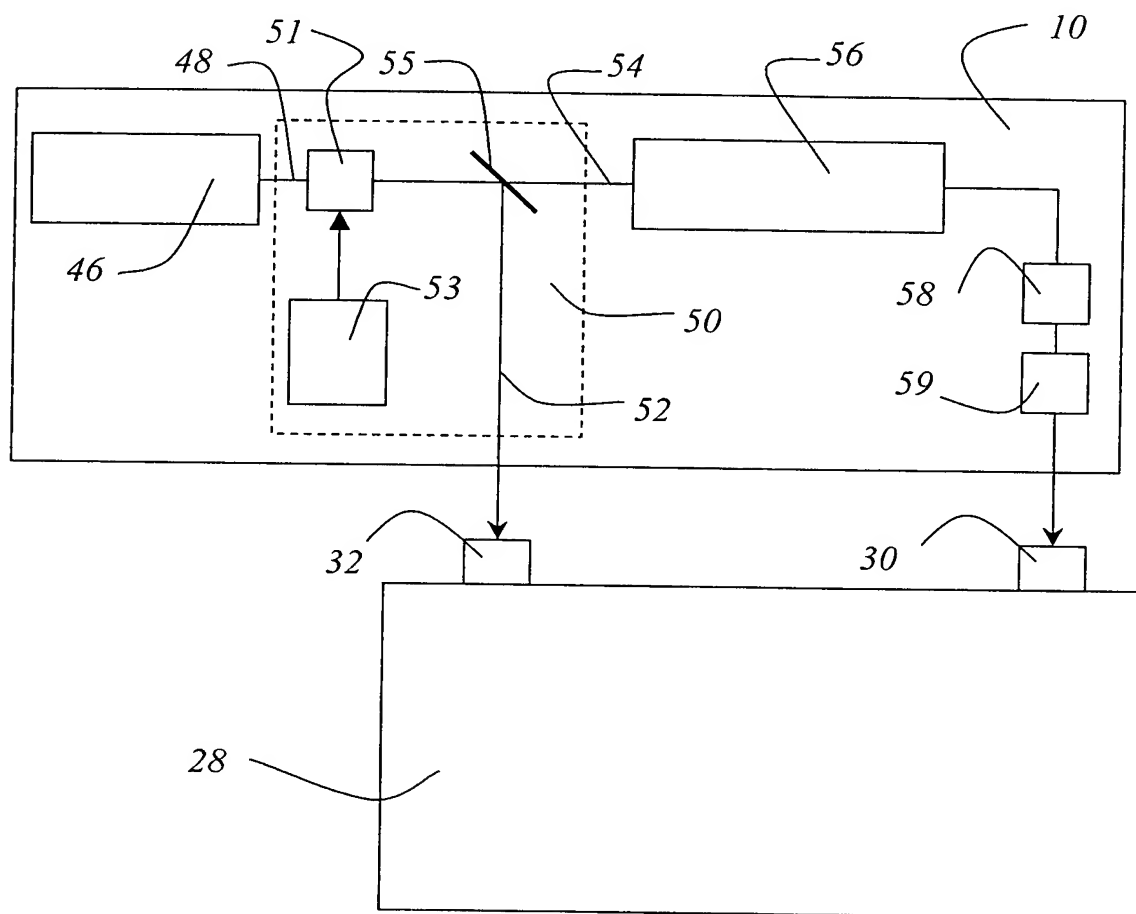


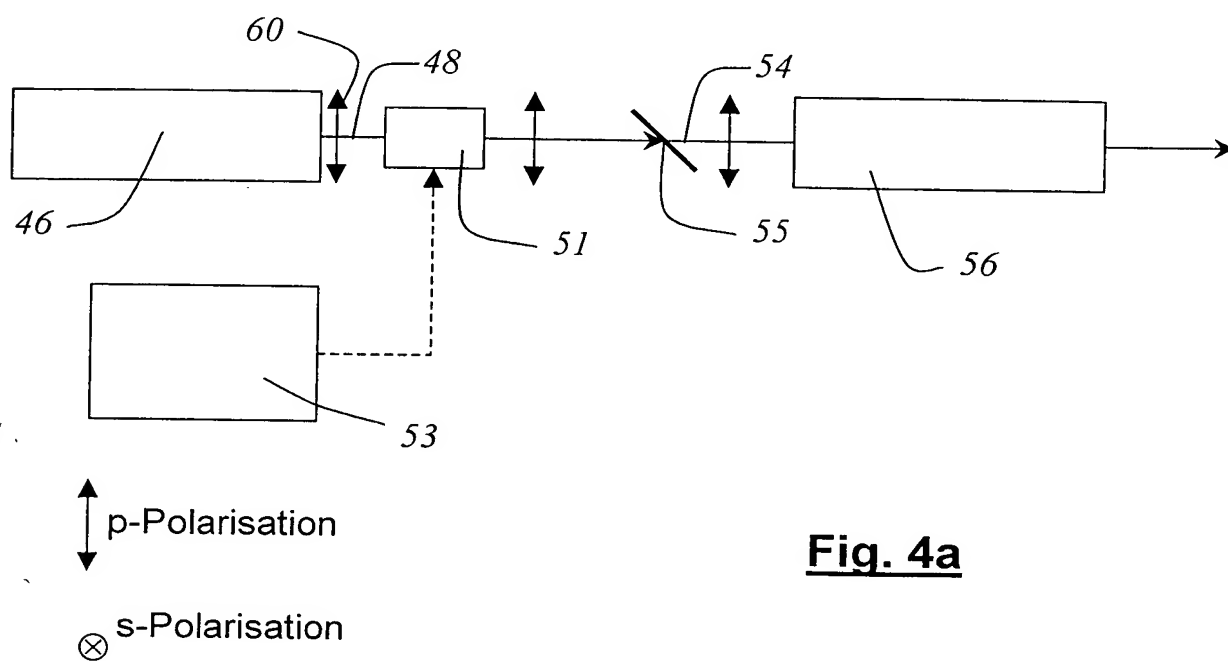
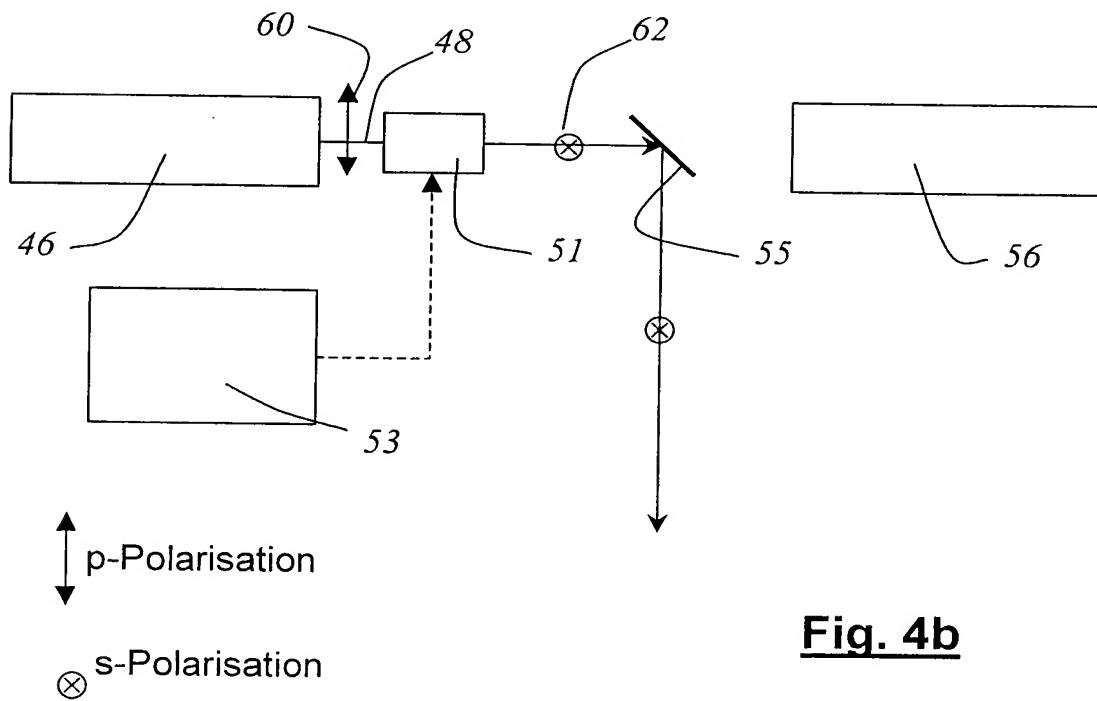
Fig. 1

Stand der Technik

**Fig. 2**

Stand der Technik

**Fig. 3**

**Fig. 4a****Fig. 4b**

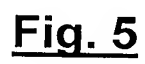


Fig. 5



Creation date: 10-05-2003
Indexing Officer: JROMANI - JOHN ROMANI
Team: OIPEBackFileIndexing
Dossier: 10064653

Legal Date: 05-12-2003

No.	Doccode	Number of pages
1	PA..	6

Total number of pages: 6

Remarks:

Order of re-scan issued on